

VI型分泌系统2核心组分VgrG对禽致病性大肠杆菌致病性的影响

刘新^{1,2} 王少辉² 孟庆美² 韩先干² 许漩² 杨登辉² 丁铲² 彭大新^{1*} 于圣青^{2*}

(1. 扬州大学兽医学院 江苏 扬州 225009)

(2. 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241)

摘要:【目的】构建禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) VI型分泌系统2 (Type VI secretion system 2, T6SS2)结构基因 *vgrG* 缺失株, 研究其对 APEC 生物学特性及致病性的影响。【方法】通过 Red 同源重组方法构建 DE719 菌株 *vgrG* 基因缺失株, 并利用低拷贝质粒 pSTV28 构建互补株。比较分析野生株、缺失株与互补株的生长特性、运动性、生物被膜形成能力、黏附侵袭能力、动物致病力等差异。【结果】*vgrG* 基因缺失不影响 DE719 的生长速度、运动能力及生物被膜形成能力。致病性试验表明缺失 *vgrG* 导致体内定殖能力及致病力显著下降, 然而对 DF-1 细胞的黏附能力增强。【结论】T6SS2 核心组分 VgrG 在 APEC 感染过程中发挥重要作用, 为了解 APEC 的致病作用提供参考。

关键词: 禽致病性大肠杆菌, *vgrG* 基因, 致病性

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31572523, 31370045); Chinese Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201303044); Shanghai Key Project on Agricultural Development through Science and Technology (No. 2015HNG1-9); National Basic Fund for Institutes, Shanghai Veterinary Research Institute (No. 2015JB08)

*Corresponding authors: PENG Da-Xin: Tel: 86-514-87979224; E-mail: pengdx@yzu.edu.cn
YU Sheng-Qing: Tel: 86-21-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

Received: October 10, 2015; **Accepted:** January 13, 2016; **Published online** (www.cnki.net): January 21, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31572523, 31370045); 公益性农业(科研)专项项目(No. 201303044); 上海市科技兴农重点攻关项目(No. 2015HNG1-9); 中央级科研院所基本科研业务费项目(No. 2015JB08)

*通讯作者: 彭大新: Tel: 86-514-87979224; E-mail: pengdx@yzu.edu.cn

于圣青: Tel: 86-21-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

收稿日期: 2015-10-10; 接受日期: 2016-01-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-21

Effects of type VI secretion system 2 core component VgrG on the pathogenicity of avian *Escherichia coli*

LIU Xin^{1,2} WANG Shao-Hui² MENG Qing-Mei² HAN Xian-Gan² XU Xuan²
YANG Deng-Hui² DING Chan² PENG Da-Xin^{1*} YU Sheng-Qing^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

(2. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

Abstract: [Objective] To determine the role of type VI secretion system 2 (T6SS2) core component VgrG in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), we detected the biological characteristics and pathogenicity of APEC *vgrG* gene mutant strain. [Methods] We constructed the *vgrG* gene mutant strain and complementary strain of APEC DE719 by the Red recombination system and plasmid pSTV28. Then we analyzed the growth curve, motility, biofilm formation, adhesion and invasion capacity to DF-1 cells and virulence to duck of wild-type strain, mutant strain and complementary strain. [Results] The inactivation of *vgrG* gene did not affect the growth and motility, nor the biofilm formation of APEC. The *vgrG* gene mutant showed significantly decreased survival capacity and attenuated virulence in ducks. However, the adhesion capacity to DF-1 cells increased. [Conclusion] T6SS2 core component VgrG was involved in the process of APEC infection, which would help us to comprehensive understand the pathogenicity of APEC.

Keywords: Avian pathogenic *Escherichia coli*, *vgrG* gene, Pathogenicity

禽大肠杆菌病是由禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)引起鸡、火鸡及其他禽类的急、慢性传染病,常见发病症状主要有关节滑膜炎、卵黄性腹膜炎、败血症,甚至脑膜炎等^[1-2]。由于 APEC 的复杂血清型及广泛的耐药性,严重制约了养禽业的健康发展。

病原菌侵入宿主后,在宿主体内是一个动态的、复杂的多因素作用过程,毒力因子在致病过程中发挥重要作用,因此阐明毒力相关基因的作用机制对于防控相关疾病至关重要。蛋白分泌系统与病原菌的毒力密切相关,编码细菌分泌系统的基因簇多位于致病岛^[3-6]。VI 型分泌系统(Type VI secretion system, T6SS)是一种接触依赖性分泌系统,能够向邻近的细胞注射效应因子杀死竞争细胞,从而汲取有利的营养物质。T6SS 的装置和噬菌体的结构很相似,主要由溶血素共调节蛋白(Hcp)和缬氨酸谷氨酸重复蛋白(VgrG)组成,并且 Hcp 和 VgrG 作为 T6SS 的效应蛋白与 T6SS 的功能直接相关^[7],研究表明 T6SS 分泌蛋白 VgrG 可调节多种细胞的功能。在很多致病性大肠杆菌中存在完整的 T6SS 编码基因簇,并保持高度同源性^[7],

目前已知在 APEC 中存在 3 个 T6SS 基因簇,分别为 T6SS1、T6SS2、T6SS3。霍乱弧菌 T6SS 相关蛋白的功能研究较多^[8-10],但关于 APEC 中 T6SS 核心蛋白的功能研究甚少,具体作用尚不十分清楚。因此,本文构建 APEC DE719 菌株的 *vgrG* 基因缺失株,并分析其在 APEC 感染过程中的作用,为进一步研究 APEC 的致病机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

APEC 菌株 DE719 由本实验室分离自某养鸭场病鸭,经鉴定为 O2 血清型,对禽类(鸡、鸭)具有致病性^[11];大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自天根(北京)生化科技有限公司。质粒 pET30a、pKD46、pKD3、pCP20 由本实验室保存,互补质粒 pSTV28 购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 主要试剂和仪器

质粒小提试剂盒购自天根(北京)生化科技有限公司;2 \times PCR Mix、蛋白 Marker、DNA marker 购自北京康为世纪生物科技有限公司;高保真酶、限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司。PCR 仪购自

ABI 公司；核酸电泳仪及全自动凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司。

1.3 引物设计

根据 APEC DE719 菌株 T6SS2 基因岛 *vgrG* 基因序列^[11], 设计 *vgrG* 基因缺失引物、缺失鉴定引物、互补引物及 *vgrG* 基因表达引物(表 1), 由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.4 缺失株及互补株构建

根据 Datsenko 等^[12]的方法, 利用 Red 同源重组酶构建 *vgrG* 基因缺失株。以 pKD3 质粒为模板, 用引物 *vgrGmutant-F/vgrGmutant-R* 扩增含有氯霉素抗性基因的短同源臂片段, 将其电转化入含有 pKD46 质粒的 DE719 感受态细胞中, 挑取疑似阳性缺失株单克隆后通过 PCR 方法, 分别使用引物 *vgrGup-F/vgrGdown-R* 进行外侧检测, 使用引物 *vgrG-F/vgrG-R* 进行缺失基因内部检测, 使用引物 *vgrGup-F/C1、C2/vgrGdown-R* 进行交叉 PCR 鉴定 *vgrG* 基因缺失株。

以 DE719 菌株基因组为模板, 利用互补引物扩增 *vgrG* 基因互补片段, 经 *EcoR I/BamH I* 双酶切后连接到 pSTV28 质粒, 构建互补质粒 pSTV28-*vgrG*, 电转化至缺失株中, 构建互补株。

1.5 VgrG 蛋白表达检测

以 DE719 菌株基因组为模板, 利用原核表达引物 *vgrGexpression-F/vgrGexpression-R* 扩增 *vgrG* 基因表达片段, 经过 *BamH I/Xho I* 双酶切后连接到 pET30a 质粒, 构建原核表达质粒 pET30a-*vgrG*, 转化入 BL21(DE3)中进行表达, 纯化蛋白后免疫新西兰大白兔, 收集免疫血清。分别将野生株 DE719、*vgrG* 基因缺失株、*vgrG* 基因互补株在相同条件下培养, 收集菌体, 制备全菌蛋白, 然后通过 Western blot 检测不同细菌中 VgrG 蛋白表达情况。

1.6 生长曲线及运动性测定

测定野生株 DE719、*vgrG* 基因缺失株、*vgrG* 基因互补株的生长速度及运动性, 分析 T6SS 核心蛋白 VgrG 是否影响各菌株的生长及运动特性。将菌液按 1:100 接种于 LB 培养基(g/L, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母提取物 5), 于 37 °C、200 r/min 振荡培养, 每小时取样并测定菌液的 OD_{600} , 记录并绘制生长曲线图。将培养至 $OD_{600}=1$ 的新鲜菌液分别点样于 LB 运动平板上, 37 °C 静置培养 12 h, 测定细菌运动直径。

1.7 生物被膜形成能力测定

采用 96 孔板法测定野生株 DE719、*vgrG* 基因

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	用途 Usage
<i>vgrGmutant-F</i>	TGCTGCATGGTGGGAATCATTTGGTCCGTGAATGAATCA GGGAGGTCATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Construction of <i>vgrG</i> mutant strain
<i>vgrGmutant-R</i>	GATTCACAGGCGTATAAAGCAAATACAATCACCATGTTT TATATCCTGCACATATGAATATCCTCCTTAG	
<i>vgrG-F</i>	GTGATGAGTGTGGATGTCGC	Identification of <i>vgrG</i> mutant strain
<i>vgrG-R</i>	CTATCCGTTTCAGATGAATATC	
<i>vgrGup-F</i>	CGATTGTGGACATGAACCTGC	Identification of <i>vgrG</i> mutant strain
<i>vgrGdown-R</i>	GGTAAGCTCATCTGCCAACGA	
C1	TTATACGCAAGGCGACAAGG	Identification of <i>vgrG</i> mutant strain
C2	GATCTTCCGTCACAGGTAGG	
<i>vgrGcomplement-F</i>	CGAGAATTCGCACACGCTGAGTTTACG	Construction of <i>vgrG</i> complementary strain
<i>vgrGcomplement-R</i>	GTAGGATCCCTAAGCTCATCTGCCAACG	
<i>vgrGexpression-F</i>	GCGGATCCATGTCCTTAAAAGGTCTTCG	Expression of <i>vgrG</i> gene
<i>vgrGexpression-R</i>	GTGCTCGAGTCCGTTTCAGATGAATATC	

注：下划线为限制性酶切位点。

Note: The restriction sites are underlined.

缺失株、*vgrG* 基因互补株的生物被膜形成能力。将野生株 DE719、*vgrG* 基因缺失株、*vgrG* 基因互补株新鲜菌液按每孔 200 μ L 加入 96 孔聚苯乙烯微孔板, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。弃去培养液, 用无菌 PBS 洗涤 3 次后加入 200 μ L 0.1% 结晶紫溶液染色 30 min。然后用无菌 PBS 洗涤 5 次, 自然风干后加入 200 μ L 95% 乙醇, 作用 5–10 min, 测定 OD_{595} , 以无菌培养基作为阴性对照。

1.8 细胞黏附与侵袭试验

将新鲜培养菌液用 DMEM 洗涤后, 按 MOI=100 感染鸡成纤维细胞 DF-1, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的细胞培养箱中感染 2 h, 以 DMEM 作为阴性对照。无菌 PBS 洗涤后用 0.5% Triton-X 100 裂解细胞并倍比稀释, 涂平板, 进行菌落计数。

细胞侵袭试验与细胞黏附试验的感染方式相同, 感染 2 h 后以无菌 PBS 洗涤 3 次, 用含有庆大霉素(100 mg/L)的 DMEM 作用 1 h 杀死胞外细菌, 然后用 0.5% Triton-X 100 裂解细胞并倍比稀释, 涂平板, 进行菌落计数^[11]。

1.9 动物致病性测定

将对数生长期细菌用无菌 PBS 洗涤 3 次, 然后重悬, 以每只 1×10^4 CFU 的剂量感染 7 日龄樱桃谷鸭, 每组 8 只, 连续观察 7 d, 记录发病死亡情况。

测定不同菌株在樱桃谷鸭肺、肝、脾中的定殖能力, 通过气管感染 7 日龄樱桃谷鸭, 攻毒剂量为每只 1×10^8 CFU, 每组 10 只。24 h 后, 无菌采取肺、肝、脾, 加入无菌 PBS 匀浆, 倍比稀释涂平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后进行菌落计数。

2 结果与分析

2.1 基因缺失株、互补株的构建及鉴定

利用 Red 同源重组系统构建基因缺失株, 对挑取的疑似基因缺失株进行 PCR 鉴定, 结果显示缺失株无法扩增出 *vgrG* 基因, *vgrGup-F/vgrGdown-R* 引物外侧鉴定显示缺失株的条带为替换了 *vgrG* 基因的氯霉素抗性片段, 且以 *vgrGup-F/C1*、*C2/vgrGdown-R* 为引物缺失株中可扩增出目的条带(图 1)。PCR 产物测序结果表明, 缺失株 DE719 Δ *vgrG* 构建成功。

以 DE719 基因组为模板, 利用互补引物扩增 *vgrG* 基因互补片段, 酶切后连接到 pSTV28 质粒, 成功构建 pSTV28-*vgrG* 互补质粒, 并电转化入缺失株中得到互补株(结果未展示)。

2.2 VgrG 蛋白表达检测

构建 pET30a-*vgrG* 原核表达质粒, 转化入大肠杆菌 BL21(DE3), 结果显示表达了 VgrG-His 融合蛋白(图 2A), 纯化 VgrG 蛋白后免疫新西兰大白

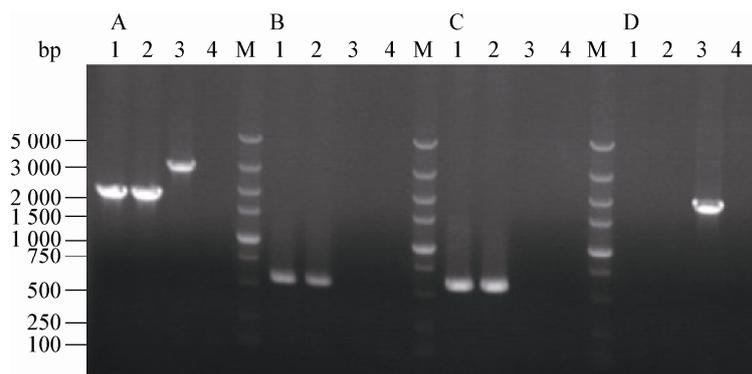


图 1 基因缺失株 DE719 Δ *vgrG* 的 PCR 鉴定

Figure 1 Identification of mutant strain DE719 Δ *vgrG* by PCR

注: A: 缺失株 DE719 Δ *vgrG* 外侧引物 *vgrGup-F/vgrGdown-R* 鉴定; B: 缺失株 DE719 Δ *vgrG* 交叉引物 *vgrGup-F/C1* 鉴定; C: 缺失株 DE719 Δ *vgrG* 交叉引物 *C2/vgrGdown-R* 鉴定; D: 缺失株 DE719 Δ *vgrG* 内侧引物 *vgrG-F/vgrG-R* 鉴定。M: DNA marker; 1–2: 缺失株 DE719 Δ *vgrG*; 3: 野生株 DE719; 4: 阴性对照。

Note: A: Identification of mutant strain DE719 Δ *vgrG* using primers *vgrGup-F/vgrGdown-R*; B: Identification of mutant strain DE719 Δ *vgrG* using primers *vgrGup-F/C1*; C: Identification of mutant strain DE719 Δ *vgrG* using primers *C2/vgrGdown-R*; D: Identification of mutant strain DE719 Δ *vgrG* using primers *vgrG-F/vgrG-R*. M: DNA marker; 1–2: Mutant strain DE719 Δ *vgrG*; 3: Wild-type strain DE719; 4: Negative control.

兔并获得免疫血清。通过 Western blot 检测各菌中 VgrG 蛋白表达情况,结果显示野生株 DE719 和 *vgrG* 基因缺失株中无法检测到 VgrG 蛋白,而互补株中可以表达 VgrG 蛋白(图 2B)。

2.3 生长曲线及运动性测定

生长曲线结果显示 DE719 Δ *vgrG* 的生长速度与野生株无显著变化,表明 *vgrG* 基因不影响 DE719 的生长速度(图 3A)。运动性结果显示,*vgrG* 基因

缺失株在 0.5%的琼脂 LB 平板上菌圈直径均为 11 mm \pm 2 mm (图 3B-C),表明 VgrG 不影响 APEC 的运动性。

2.4 生物被膜形成能力测定

生物被膜形成能力测定结果显示,DE719 Δ *vgrG* 的生物被膜形成能力低于野生株,但差异不显著($P>0.05$),表明 VgrG 不影响 APEC DE719 的生物被膜形成能力(结果未展示)。

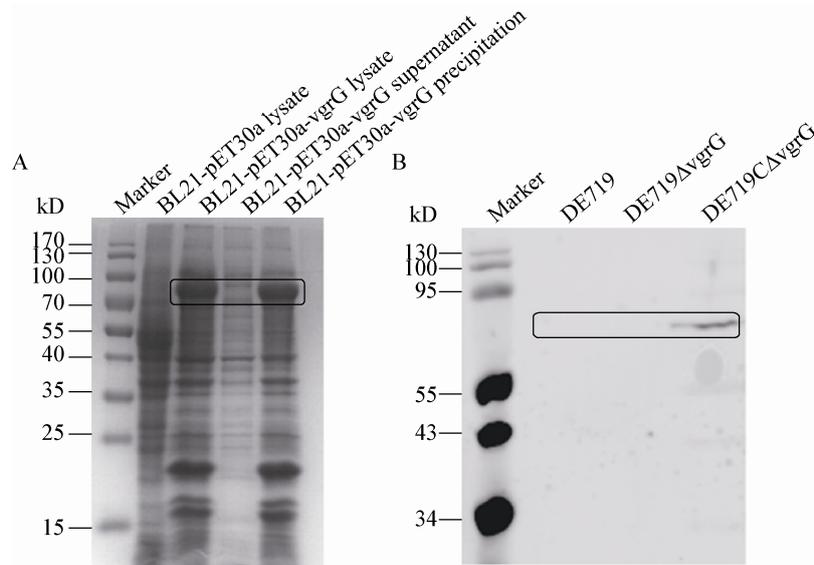


图 2 VgrG 蛋白表达检测

Figure 2 Detection of VgrG expression

注: A: VgrG 原核表达; B: VgrG 蛋白表达检测。

Note: A: Expression of VgrG protein; B: Detection of VgrG expression.

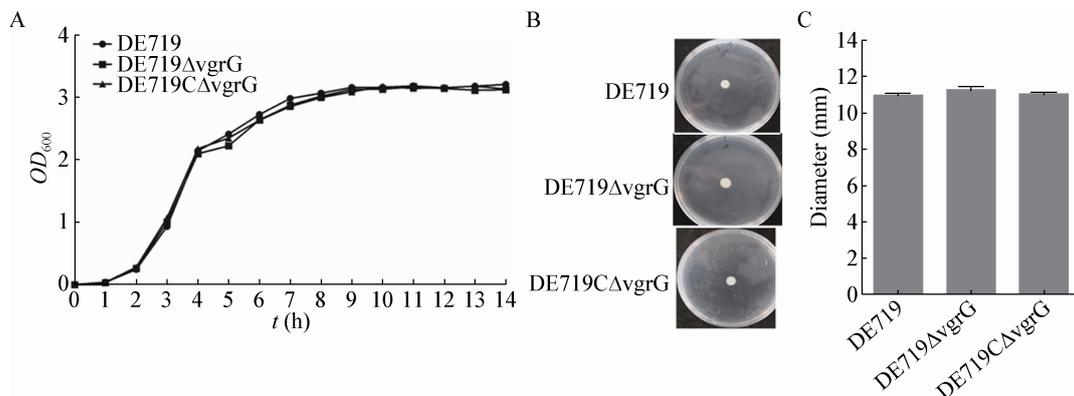


图 3 生长曲线及运动性能力测定

Figure 3 Bacterial growth kinetics and motility assays

注: A: 生长曲线; B: 0.5% LB 琼脂平板运动性; C: 0.5% LB 琼脂平板运动性直径。

Note: A: Growth curves; B: Motilities on 0.5% LB agar; C: Diameter of each strains on 0.5% LB agar.

2.5 黏附侵袭能力测定

黏附侵袭试验结果显示, 缺失株 DE719 Δ vgrG 对 DF-1 细胞的黏附能力是野生株的 1.2 倍 ($P < 0.05$), 互补株的黏附能力恢复到野生株水平。DE719 Δ vgrG 侵袭能力虽有所增强, 但是差异不显著 ($P > 0.05$) (图 4)。

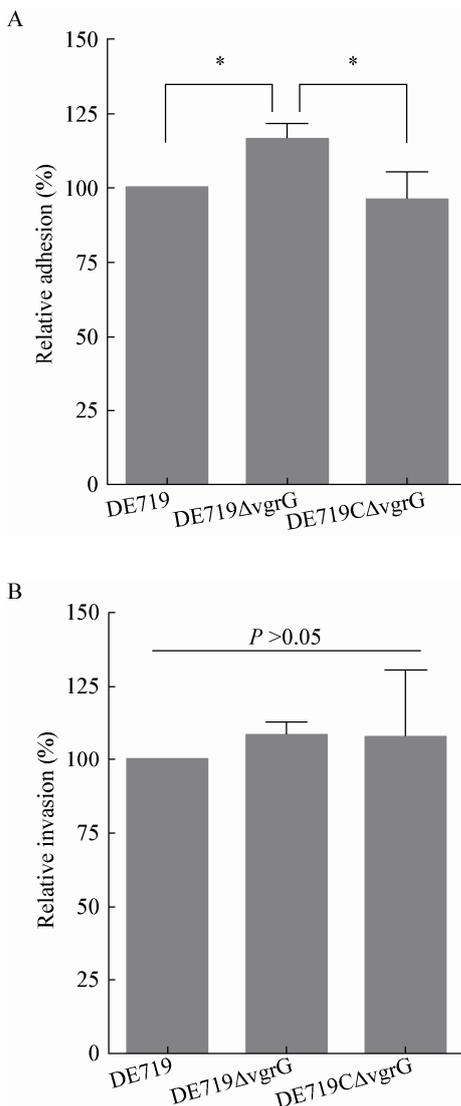


图 4 DF-1 细胞黏附侵袭试验结果

Figure 4 Adhesion and invasion capacity of APEC to DF-1 cells

注: A: 相对黏附率; B: 相对入侵率。

Note: A: Relative adhesion; B: Relative invasion.

2.6 致病性测定

动物攻毒试验结果显示, APEC 菌株 DE719、DE719 Δ vgrG、DE719C Δ vgrG 对雏鸭的致死率分别为 100% (8/8)、62.5% (5/8)、75% (6/8) (图 5), 并且野生株 DE719 攻毒组的雏鸭死亡时间更早, 表明 *vgrG* 基因缺失导致 DE719 对樱桃谷鸭的致病力减弱, 互补株的致病力部分回复。

2.7 体内载菌量测定

体内载菌量统计结果显示(图 6), 缺失株 DE719 Δ vgrG 在肺、肝、脾中的定殖能力均明显低于野生株 ($P < 0.05$)。虽然互补株的定殖能力高于缺失株 DE719 Δ vgrG, 但差异不显著 ($P > 0.05$), 且其未完全恢复到野生株水平。

3 讨论

APEC 属于肠道外致病性大肠杆菌, 可定殖于禽类不同组织器官中, 引起败血症等多种病变, 并因其复杂血清型与耐药性进化愈来愈难以防治, 给养禽业造成巨大经济损失。分泌系统广泛存在于致病菌中, 其中 T6SS 存在于超过 1/4 的细菌中^[6-7,13-14]。研究证明 T6SS 存在 4 种保守蛋白, 其分别是: Hcp、VgrG、细胞内增殖蛋白(IcmF)和细胞器运输蛋白质(DotU), 其中 Hcp 与 VgrG 既是分泌蛋白又是结构蛋白^[8,15], 然而大多数 T6SS 组成蛋白的功能尚不清楚。T6SS 与许多细菌的致病性

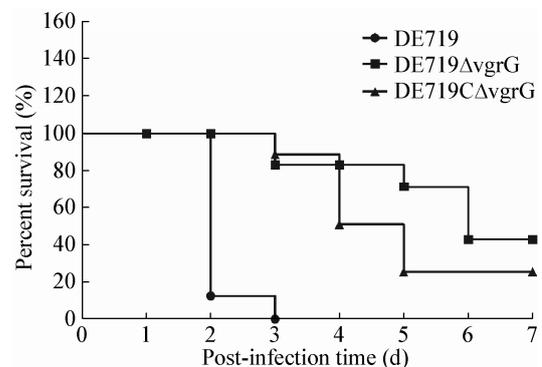


图 5 存活曲线

Figure 5 Survival curve

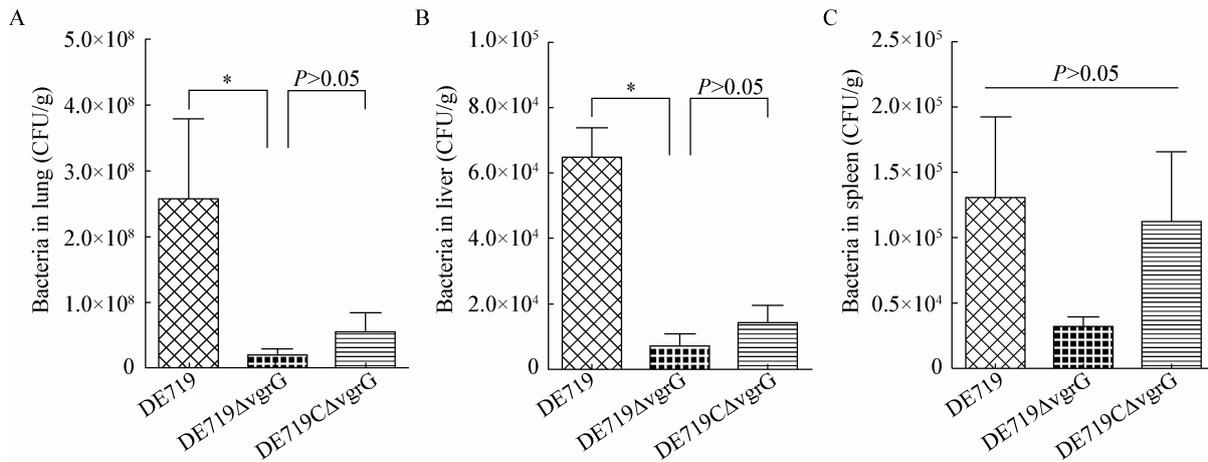


图6 组织载菌量测定

Figure 6 Bacterial loads in lungs (A), livers (B) and spleens (C) of infected ducks at 24 h post-infection

相关,在细菌与宿主、细菌与细菌之间相互作用过程中发挥重要作用^[16-17]。在APEC基因组发现了3个不同T6SS(T6SS1、T6SS2、T6SS3),其中T6SS1、T6SS3与肠黏附性大肠杆菌的T6SS相似,而T6SS2与新生儿脑膜炎大肠杆菌(Newborn meningitis *E. coli*, NMEC) RS218的T6SS具有很高的同源性^[18]。在APEC中T6SS1核心组件ClpV和Hcp在参与肌动蛋白在上皮细胞重排。NMEC菌株RS218的T6SS核心组件Hcps在侵袭人脑微血管内皮细胞,如黏附和侵袭人脑微血管内皮细胞、细胞因子和趋化因子的释放、细胞凋亡等过程中发挥重要作用。但是,T6SS3缺少几个关键基因而不具备分泌功能^[19-20]。我们前期研究表明DotU对APEC T6SS2的分泌功能发挥重要作用,缺失DotU导致APEC DE719不能分泌效应因子Hcp1,从而导致毒力降低^[11]。因此,本文构建vgrG基因缺失株,并分析其生物学特性,从而了解VgrG在APEC感染过程中的作用。

T6SS属于接触依赖型分泌系统,在体外培养过程中T6SS组分的转录及表达量较低,但在感染宿主细胞过程中T6SS表达量增高,从而有利于细菌的感染及致病^[13-14]。我们前期通过荧光定量PCR检测在LB培养基中不同APEC菌株的vgrG

基因转录水平,结果显示vgrG基因转录水平较低($\Delta C_t=5.75$),与其他报道一致。本研究中通过Western blot无法检测到野生株中VgrG蛋白的条带,其可能原因是野生株中VgrG蛋白表达量太低所致。缺失株无法检测到VgrG蛋白,互补株可以检测到VgrG蛋白进一步说明基因缺失株和互补株构建成功。通过荧光定量PCR检测野生株DE719、vgrG基因缺失株与vgrG基因互补株中vgrG基因上下游基因转录水平发现,vgrG基因缺失并不影响上下游基因的转录,说明vgrG基因缺失对其上下游基因不存在极性作用。

生长曲线、运动性试验及生物被膜试验结果表明,vgrG基因不影响APEC DE719的生长速度、运动能力及生物被膜形成能力,与T6SS核心组分vgrG基因的功能一致^[21]。并且,VgrG对APEC DE719的抗环境耐受力(酸、碱、H₂O₂)无明显影响(结果未展示)。自然条件下,APEC感染宿主时首先定殖于呼吸道,经肺进入血液循环扩散,最终导致组织器官发生病变。本研究通过模拟自然感染方式感染雏鸭,体内载菌量结果显示vgrG基因缺失株在肺脏、脾脏、肝脏中的定殖及存活能力显著低于野生株,互补株的定殖及存活能力部分恢复。解剖发现感染DE719的雏鸭肺脏

病变明显, 而缺失株 DE719 Δ vgrG 感染组雏鸭肺脏的病变较轻或无肉眼可见病变。缺失株 DE719 Δ vgrG 的体内载菌量减小, 不能引起雏鸭发病且发病日龄晚于野生株, 致病力降低。

细菌黏附定殖对病原菌感染至关重要, 是其感染宿主的第一步。细胞黏附试验表明缺失株 DE719 Δ vgrG 对 DF-1 细胞的黏附能力高于野生株, 其原因可能是 VgrG 缺失导致 T6SS2 结构发生改变, 使其他黏附相关因子暴露于细菌表面。另外, 病原菌对宿主的致病性是个复杂、动态的过程, 影响因素众多, 而细胞黏附仅仅是其中一个因素, 也有可能致致病性试验结果和细胞黏附试验结果的不一性。研究发现, NMEC 的 T6SS 通过分泌效应因子 Hcp1 发挥致病作用, 但 *hcp1* 缺失株对人脑微血管内皮细胞的黏附能力显著高于野生株, 分析发现效应因子 Hcp1 通过诱导肌动蛋白细胞骨架重排、诱导细胞凋亡及白细胞介素-6 和白细胞介素-8 的释放发挥致病作用^[20]。因此, APEC 在感染宿主细胞时有可能利用 T6SS2 将效应分子 VgrG 分泌至细胞内, 从而发挥致病作用, 其具体机制仍有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Ron EZ. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens[J]. Current Opinion in Microbiology, 2006, 9(1): 28-32
- [2] Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*"[J]. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 2002, 139(3): 155-162
- [3] Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2004, 17(1): 14-56
- [4] Rajan I, Aravamuthan S, Mande SS. Identification of compositionally distinct regions in genomes using the centroid method[J]. Bioinformatics, 2007, 23(20): 2672-2677
- [5] Cascales E. The type VI secretion tool kit[J]. EMBO Reports, 2008, 9(8): 735-741
- [6] Filloux A, Hachani A, Bleves S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes[J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 6): 1570-1583
- [7] Shrivastava S, Mande SS. Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes[J]. PLoS One, 2008, 3(8): e2955
- [8] Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 2006, 61(5): 1267-1282
- [9] Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, et al. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(39): 15508-15513
- [10] Zheng J, Leung KY. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 66(5): 1192-1206
- [11] Wang SH, Dai JJ, Meng QM, et al. DotU expression is highly induced during *in vivo* infection and responsible for virulence and Hcp1 secretion in avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 588
- [12] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645
- [13] Filloux A. The type VI secretion system: a tubular story[J]. The EMBO Journal, 2009, 28(4): 309-310
- [14] Boyer F, Fichant G, Berthod J, et al. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: what can be learned from available microbial genomic resources?[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 104
- [15] Wu HY, Chung PC, Shih HW, et al. Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(8): 2841-2850
- [16] Jani AJ, Cotter PA. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore[J]. Cell Host & Microbe, 2010, 8(1): 2-6
- [17] Basler M, Ho BT, Mekalanos JJ. Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions[J]. Cell, 2013, 152(4): 884-894
- [18] Ma JL, Sun M, Bao YL, et al. Genetic diversity and features analysis of type VI secretion systems loci in avian pathogenic *Escherichia coli* by wide genomic scanning[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2013, 20: 454-464
- [19] de Pace F, Nakazato G, Pacheco A, et al. The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(12): 4990-4998
- [20] Zhou Y, Tao J, Yu H, et al. Hcp family proteins secreted via the type VI secretion system coordinately regulate *Escherichia coli* K1 interaction with human brain microvascular endothelial cells[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(3): 1243-1251
- [21] Ma JL, Bao YL, Sun M, et al. Two functional type VI secretion systems in avian pathogenic *Escherichia coli* are involved in different pathogenic pathways[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(9): 3867-3879